

THESIS
München
1968

**Regulation
der Proteinsynthese:
Der Mechanismus der
Katabolitenrepression**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

MANFRED / SCHWEIGER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. ADOLF BUTENANDT

REGULATION DER PROTEINSYNTHESE:
DER MECHANISMUS DER KATABOLITENREPRESSION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Manfred Schweiger
aus Königsberg/Pr.

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. H. Hofschneider
Dekan: Prof. Dr. F. Holle
Tag der mündlichen Prüfung: 7. 5. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter der
Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Zillig
im Max-Planck-Institut für Biochemie, München,
durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor
Dr. A. Butenandt für die allzeit großzügige
Förderung der Arbeit.

Herrn Doz. Dr. W. Zillig danke ich sehr herzlich
für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.
Freundschaftliche, stimulierende Hinweise ver-
danke ich Herrn Professor Dr. W. Sauerbier.
Die Studienstiftung des Deutschen Volkes und
die Deutsche Forschungsgemeinschaft gewährten
Stipendien.

EINLEITUNG

HAUPTTEIL

I Ziel der Arbeit

II Regulation bei Mikroorganismen

A Allgemeine Herabsetzung der Lebensfunktionen

B Operon-Regulation

C Steuerung der Enzymaktivität

D Die allgemeine Kataboliten-Repression (Glucose-Effekt)

1 Der eigentliche Glucose-Effekt

2 Die Endprodukt-Hemmung

3 Die Kataboliten-Repression

a Das Auftreten der Kataboliten-Repression

i Stickstoffmangel

ii Mangelmedien

iii Hemmstoffe

iiii Schädigung der Zelle durch energiereiche Strahlung

b Die Auswirkung der Kataboliten-Repression auf die Zellfunktionen

i Stoffwechsel

ii Protein- und RNA-Synthese

III Beziehungen zwischen DNA-Replication und Kataboliten-Repression

A Die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Phleomycin

B Die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Mitomycin C

C Der Angriffspunkt des Mitomycin C bei der induzierten Synthese von β -Galactosidase

D Der Einfluß von Mitomycin C auf die DNA-, RNA und Protein-Synthese

DISKUSSION

- I Die Hemmung der Enzym-Induktion durch Hemmung der DNA-Replication
- II Deutung der Hemmung der Enzym-Induktion
 - A "Cytoplasmic alteration hypothesis"
 - B "Nuclear inactivation hypothesis"
 - C Diskussion der Hypothesen
- III Modellvorstellungen zum Mechanismus der Kataboliten-Repression

MATERIAL UND METHODEN

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

EINLEITUNG

"Es wird sich immer mehr erweisen, daß ärztliches Denken und Handeln von den Ergebnissen der molekularen Biologie in steigendem Maße beeinflußt und daß die Ergebnisse dieser Forschungsrichtung hohe Anforderungen an die Ethik im Beruf des Arztes stellen werden. Daher ist es nötig, daß jeder Arzt sich mit der Entwicklung der molekularen Biologie vertraut macht, und nicht nur der Arzt."
(A. Butenandt, 1967).

Seit fast 70 Jahren ist bekannt (Duclaux, 1899; Dienert, 1900), daß Mikroorganismen eine gewisse Anpassungsfähigkeit an ihre Umgebung besitzen. Es handelt sich dabei im allgemeinen um eine Vermehrung oder Verminderung der Aktivität einzelner oder mehrerer Enzyme der Zelle. Diese Form der Anpassungsfähigkeit wird enzymatische Adaptation genannt. Sie kann über die Regulation von Enzym-Synthesen oder über die Beeinflussung von Enzym-Aktivitäten bei gleichbleibender Enzymmenge erfolgen. Bei Bakterien sind es vor allem die folgenden Regulationsmechanismen, die im Mittelpunkt des Interesses stehen:

1. Unter ungünstigen Lebensbedingungen erfolgt eine Herabsetzung praktisch aller Lebensfunktionen. In einer Flüssigkeitskultur schaltet z. B. *Escherichia coli* bei einer bestimmten Zellkonzentration von der logarithmischen auf die stationäre Wachstumsphase um, d. h. es erfolgt eine Einstellung der Vermehrung und eine Herabsetzung des Stoffumsatzes (Burrow, Moulder und Lewert, 1965). Ein weiteres Beispiel bildet *Bacillus subtilis*, der den Stoffwechsel umstellt und eine starke, widerstandsfähige Kapsel bildet (Sporulation), wenn die Umweltbedingungen ungünstig sind (Pelczar und Reid, 1965).

2. Es wird die Synthese einer großen Gruppe von Enzymen eingeschränkt, wenn im Medium Kohlenstoffquellen reichlich vorhanden sind (Kataboliten-Repression) (Magasanik, 1961).
3. Mehrere Enzyme mit einer gemeinsamen, übergeordneten Funktion werden koordiniert an- oder abgeschaltet (Operon-Regulation) (Jacob und Monod, 1961).
4. Die katalytische Aktivität von Enzymen wird durch Konformationsänderungen am Enzymprotein reguliert (Allosterie). Während über die Mechanismen der Sporulation bzw. Germination, der Operon-Regulation und der Allosterie einiges bekannt ist, besteht bezüglich des Mechanismus der Kataboliten-Repression keine klare Vorstellung.

HAUPTTEIL

I Ziel der Arbeit

Es war von Interesse, experimentell Informationen über die Kataboliten-Repression zu sammeln, um auf diesem Wege zu einem Verständnis des Mechanismus zu gelangen. In dieser Arbeit werden Experimente beschrieben, die den Schluß rechtfertigen, daß eine Hemmung der DNA-Synthese zu einer irreversiblen Operon-Repression infolge von Kataboliten-Repression führt. Die Kataboliten-Repression hat wahrscheinlich ihre Ursache in einer Veränderung der DNA.

II Regulation bei Mikroorganismen

Zum Studium von Regulationsproblemen sind Bakterien besonders geeignet: 1) Sie sind haploid. 2) Die gegenseitige Beeinflussung ist wahrscheinlich geringer als bei Zellen eines Gewebeverbandes. 3) Sie haben eine kurze Generationszeit. 4) Die Zellen lassen sich technisch leicht kultivieren und handhaben. 5) Die strukturelle Organisation der Bakterien als Prokaryonten ist einfacher als die der Eukaryonten. 6) Das genetische Material der Bakterien läßt sich besonders einfach manipulieren. Durch die Parasexualität (Pontecorvo, 1954, 1956) kann DNA ausgetauscht oder ergänzt werden: Dazu dienen Transformation, Transduction, Konjugation

und Sexduction. Besonders zahlreiche Ergebnisse über Regulation wurden an Bakterien, speziell *Escherichia coli*, gewonnen.

Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß Schlüsse, die aus an Bakterien gewonnenen Ergebnissen gezogen werden, nicht ohne weiteres auf höher organisierte Zellen, wie z. B. Eukaryonten übertragen werden können. Ja, es gibt sogar eine ganze Reihe von Hinweisen darauf, daß höher organisierte Zellen zumindest zusätzlich über andere Regulationsmechanismen verfügen. Möglicherweise hängt das mit den längeren Generationszeiten dieser Zellen zusammen. Die verschiedenen Formen der Regulation, Herabsetzung der Lebensfunktionen, Operon-Regulation, Steuerung der Enzymfunktion über Allosterie und die Kataboliten-Repression sind miteinander eng verbunden. Um die einzelnen Phänomene gegeneinander abzugrenzen und die Beziehungen zur Kataboliten-Repression zu demonstrieren, ist es empfehlenswert, zunächst die verschiedenen Regulationsformen zu besprechen.

A Allgemeine Herabsetzung der Lebensfunktionen

Eine Bakterienkultur, die auf einem flüssigen Nährboden ange-setzt wird, durchläuft gewöhnlich verschiedene Phasen. Nach dem Beimpfen vermehren sich die Zellen für eine Zeit nicht bzw. nur sehr langsam (lag-Phase). In der anschließenden logarithmischen Wachstumsphase wachsen die Bakterien mit einer konstanten Generationszeit, wobei die Zellzahl infolgedessen logarithmisch zunimmt. Bei Erreichen bestimmter Zellkonzentrationen

verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen. Essentielle Faktoren stehen nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung oder von den Bakterien produzierte und ans Medium abgegebene Stoffe behindern die Vermehrung. Es wird die stationäre Phase erreicht, bei der keine Zellvermehrung mehr stattfindet. In einem angereicherten, Aminosäuren enthaltenden Medium wird diese Phase von *Escherichia coli* Stämmen bei 5×10^9 bis 3×10^{10} Zellen pro ml erreicht. Dagegen stellen die gleichen Bakterien in Mineral-Glucose-Medium schon bei 5×10^8 bis 2×10^9 das Wachstum ein.

Wird frisches Kulturmedium mit Zellen aus der stationären Phase beimpft, beginnt nach einer lag-Phase wieder das logarithmische Wachstum, an das sich die stationäre Phase anschließt. Aus der Tatsache, daß Bakterien der stationären Phase nicht sofort nach Überimpfung beginnen, sich logarithmisch zu vermehren, kann geschlossen werden, daß der Zellstoffwechsel unter den ungünstigen Bedingungen, die zur Einstellung der Vermehrung führten, umgeschaltet worden ist und daß der Organismus eine gewisse Zeit braucht, um sich erneut umzustellen und an die veränderten günstigeren Verhältnisse zu adaptieren. Über den molekularen Mechanismus dieser Umstellung ist wenig bekannt.

Bacillen und obligate Anaerobier besitzen die Fähigkeit zur Bildung einer resistenten Dauerform in Form der Sporulation. Unter ungünstigen Umweltbedingungen bilden diese Zellen starke Zellwände und reduzieren den RNA-, Protein- und Wasser-Gehalt. Die Sporen sind gegen schädliche Einflüsse wie Trockenheit und Hitze weitgehend resistent. Parallel zur Sporulation und Germination finden Veränderungen bei den Transfer-Ribonucleinsäuren und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen statt (Mandelstam, 1967).

Zwischen dieser Regulationsform, der Reduzierung aller Lebensfunktionen und der unten diskutierten Kataboliten-Repression besteht insofern ein enger Zusammenhang, als Mutanten von *Bacillus subtilis*, die nicht sporulieren können, resistent gegen die Kataboliten-Repression sind. Bei der Rückmutation zur sporulierenden Zelle geht die Resistenz wieder verloren (Mandelstam, 1967).

B Operon-Regulation

Die positive Adaptation oder Induktion von Enzymsynthesen wurde besonders an den Enzymen des Lactose- und Galactose-Stoffwechsels (Jacob u. Monod, 1961), die negative Adaptation oder Repression an den Aminosäure-synthetisierenden Enzymen (Ames u. Hartman, 1963) studiert. Gemeinsam ist beiden Regulationsformen, daß sie durch niedermolekulare Substanzen, sogenannte Effektoren, ausgelöst werden können. Mitunter kann ein Substrat ein Enzymsystem induzieren und ein anderes reprimieren. Z. B. können Aminosäuren die Systeme, die sie abbauen, induzieren und diejenigen, die sie aufbauen, reprimieren.

Ausgehend von genetischen Befunden, die am Lactose-System im Bakterium *Escherichia coli* erhalten wurden, entwickelten Jacob und Monod (1961) ein Modell für den Mechanismus der Regulation der Enzymsynthese auf dem Wege der Operon-Regulation.

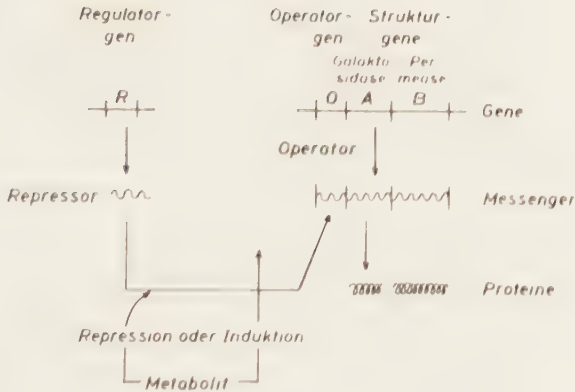


Abb. 1: Allgemeines Modell zur Regulation der Proteinsynthese (Jacob und Monod, 1961).

Die Hypothese von Jacob und Monod läßt sich in folgender Weise verallgemeinern und zusammenfassen (Abb. 1):

1. Die Synthese von Proteinen wird von sogenannten Strukturgenen dirigiert. Dabei wird jedes Gen in je ein Protein übersetzt. Die Übersetzung der Strukturgene in die entsprechenden Proteine wird von den Regulatorgenen kontrolliert. Diese haben keinen Einfluß auf die Struktur des synthetisierenden Proteins, sondern nur auf seine Synthese-Rate.

2. Das Regulatorgen (R) ist für die Bildung des Repressors verantwortlich, der an das Cytoplasma abgegeben wird und spezifisch die Übersetzung des zugehörigen Strukturgens hemmt. Wenn das Regulatorgen fehlt oder mutiert ist, wird kein oder ein veränderter Repressor gebildet und die Produkte der Strukturgene werden ständig synthetisiert, d. h. die betreffenden Enzyme werden (konstitutiv) mit maximaler Rate gebildet, ohne daß die Möglichkeit zur Kontrolle der Synthesegeschwindigkeit besteht.
3. Der Operator, der als jenes Segment des Chromosoms definiert ist, das empfindlich gegen den Repressor ist, kontrolliert die Funktion mehrerer, auf dem Genom hintereinander angeordneter, gemeinsam regulierter Strukturgene. Die Regulationseinheit, die aus den Strukturgenen, dem Operator und dem Regulatorgen besteht, wird Operon genannt.
4. Der Induktor wird an den Repressor gebunden und inaktiviert ihn dadurch.
5. Die an den Strukturgenen des Operons synthetisierte Messenger-RNA (m-RNA) ist instabil. Dieser Schluß ergibt sich aus der Kinetik der Enzymsynthese nach Entfernung des Induktors oder Zusatz eines Corepressors. Unter Corepressor wird ein niedermolekularer Aktivator des Repressors verstanden.

Von neuen Ergebnissen auf dem Gebiet der Proteinsynthese ausgehend, formulierten Gruber und Champagne (1966) sowie Cline und Bock (1966) unlängst eine Theorie für den Mechanismus der

Operon-Regulation bei Bakterien. Neu ist die Annahme einer engen Verknüpfung von Transcription (RNA-Synthese) und Translation (Proteinsynthese) an den Polysomen, wie sie aus den Experimenten von Beckwith (1963) und Newton, Beckwith, Zipser und Brenner (1965) geschlossen werden kann. Danach soll das Regulatorgen-Produkt, der Repressor, mit der naszierenden Peptidkette des ersten Strukturgens einen allosterischen Komplex bilden. In Abwesenheit eines Induktors hemmt dieser Komplex die weitere Proteinsynthese durch seine Konformation; in Gegenwart des Induktors wird die Konformation des Komplexes so geändert, daß die Synthese ablaufen kann. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht der Befund von Sommerville und Yanofsky (1965), daß bestimmte Mutationen im Anthranilsäure-Strukturgen zu einem gleichzeitigen Verlust von Reprimierbarkeit und Endprodukt-Hemmung (allosterische Inhibition) führen. Eine gleichzeitige Veränderung von zwei Enzymen durch eine Mutation ist für die Aspartokinase und die Homoserindehydrogenase beschrieben. In diesem Falle sind beide Enzyme nicht reprimierbar und darüber hinaus zeigt die Aspartokinase auch keine Endprodukt-Hemmung mehr. Man könnte dieses Ergebnis durch die Annahme erklären, daß das Produkt eines gemeinsamen Regulatorgens, welches gleichzeitig eine Untereinheit beider oligomerer Enzyme bildet, verändert wurde. Diese Regulationstheorie wird auch durch Beobachtungen von Gorini (1963) unterstützt, nach denen die Derepression des Argininsynthese-Operons durch Arginin-Entzug von der Voraussetzung abhängt, daß das Substrat des ersten Enzyms der Synthesekette, Glutamat, anwesend ist.

Mit einem ähnlichen Modell lassen sich auch eine Reihe von Befunden an höheren Organismen erklären. Da die Hämoglobinsynthetisierenden Reticulocyten der Säugetiere keinen Zellkern mehr besitzen, kann die Kontrolle der Hämoglobinsynthese nur auf der Translationsebene erfolgen. Wahrscheinlich wirkt das Häm dabei als Induktor. Daneben hat die α -Kette des Hämoglobins einen Einfluß auf die Synthese von β -Ketten und umgekehrt. Möglicherweise liegt in einem ähnlichen Mechanismus, wie er von Cline und Bock (1966) diskutiert wird, der Grund für das gleichmäßige Auftreten von α - und β -Ketten des Hämoglobins. Auch die Synthese von Cytochrom C scheint ähnlichen Regulationsmechanismen unterworfen zu sein. Cytochrom C_1 hat dabei anscheinend die Funktion eines Regulatorgen-Produkts für Cytochrom C_2 und umgekehrt. In diesem Falle spielt Sauerstoff die Rolle eines Induktors.

Als Hinweis auf die Bedeutung der Konformation des Komplexes aus entstehender Peptidkette und Regulatorgen-Produkt für die Regulation der Synthese kann auch die von Sadler und Novick (1965) nachgewiesene Temperaturempfindlichkeit der Repressorsynthese bei Mutanten des Regulatorgens angesehen werden. Da nicht anzunehmen ist, daß eine Mutation in einem Strukturgen den Proteinsynthese-Mechanismus verändert, muß gefolgert werden, daß eine derartige Mutation die Struktur des entstehenden Proteins so verändert, daß die eigene Synthese behindert wird. Auf der Basis der Theorie von Cline und Bock (1966) lassen sich die Zusammenhänge zwischen allosterischer Endprodukthemmung und Operon-Regulation, aber auch Kataboliten-Repression deuten.

C Steuerung der Enzymaktivität (Kooperativer Effekt)

Neben der Regulation der Enzymsynthese hat die Steuerung der Enzymaktivitäten eine hervorragende Bedeutung. Es ist von einer Reihe von Enzymen bekannt, daß sie mit Hilfe des kooperativen Effekts durch ihr Substrat aktiviert oder durch das Endprodukt inaktiviert werden (Kirschner, 1967). Dieser Effekt der Aktivierung bzw. Inaktivierung ist dem von Cline und Bock (1966) vorgeschlagenen Modell zufolge eng verknüpft mit der Operon-Regulation. Außerdem besteht ein Zusammenhang mit der Kataboliten-Repression, der weiter unten diskutiert wird. Voraussetzung für die Steuerbarkeit der Enzymaktivität ist, daß das Enzym aus mehreren Untereinheiten besteht. Charakteristisch sind sigmoide Substrat-Sättigungskurven, die dadurch entstehen, daß mit steigender Substrat-Konzentration der Enzymkomplex in aktivere Formen gezwungen wird, bis schließlich ein maximaler Effekt und Sättigung erreicht werden.

D Die allgemeine Kataboliten-Repression (Glucose-Effekt)

Die Rate der Synthese eines induzierten Enzyms kann durch Umweltfaktoren in weiten Grenzen geändert werden. Glucose kann die Induktion bzw. die Synthese von induzierten Enzymen stark hemmen (Glucose-Effekt). Einen ähnlichen Einfluß haben verschiedene andere Kohlenstoffquellen wie: Lactose, Gluconat, Galactose, Glycerin, Succinat und Fructose. Über die Mechanismen dieser Hemm-Effekte ist wenig bekannt. Die detaillierte Analyse des "Glucose-Effekts" zeigt jedoch, daß die Hemmung

der Enzymsynthese durch mehrere, teilweise voneinander unabhängige Mechanismen bewirkt wird, nämlich durch

- den eigentlichen Glucose-Effekt,
- die Endprodukt-Hemmung und
- die Kataboliten-Repression.

1. Der eigentliche Glucose-Effekt

Jene Hemmung der Enzymsynthese, die ausschließlich durch Glucose hervorgerufen wird, bezeichnet man als "Glucose-Effekt". Lengeler (1966) konnte zeigen, daß für den Glucose-Effekt Permeasen verantwortlich sind. Er isolierte aus den *E. coli*-Stämmen W8 und Hfr H Mutanten, die einen wenn auch verringerten Glucose-Effekt auf die Synthese der Galactose-Enzyme, aber nicht anderer Proteine zeigten. D-Serindesaminase und Tryptophanase wurden z. B. mit der gleichen Rate wie im Wildstamm gebildet. Die Mutanten erwiesen sich als *lac*-Regulator- (i^-) konstitutiv. Auch alle anderen getesteten i^- -Mutanten zeigten die gleiche herabgesetzte Empfindlichkeit des Galactose-Operons gegenüber Glucose. Revertanten verhielten sich normal, erneute Mutation zu i^- führte wieder zur Verringerung des Glucose-Effekts auf das Galactose-Operon. Der direkte Zusammenhang zwischen *i*-Gen und Glucose-Effekt auf das Galactose-Operon konnte schließlich durch Transduction gesichert werden. Es zeigte sich, daß ein hoher Gehalt an Permease, die ein Produkt des Lactose-Operons ist, die Empfindlichkeit gegenüber Glucose herabsetzt. Die Empfindlichkeit des Gal-Operons gegenüber Glucose konnte auch durch vorherige Induktion des Lac-Operons herabgesetzt werden. Damit wurde gezeigt, daß die Erhöhung der Permeasekonzentration für die Verringerung des Glucose-Effekts auf

das Gal-Operon verantwortlich ist. Zur Deutung dieses Effekts wird eine gemeinsame Träger-Substanz beim aktiven Transport von Galactose und Glucose durch die Zellwand diskutiert. Die Glucose, die in höherer Konzentration anwesend ist, besetzt alle Träger. Damit kann Galactose von der Zelle nicht aufgenommen werden und die Synthese der Galactose-abbauenden Enzyme wird nicht induziert. Bei konstitutiver Synthese dieser Enzyme verliert die Glucose diesen Angriffspunkt. Die Spezifität dieses Effekts, der nur das Galactose-Operon, nicht aber die Gene für Tryptophanase und D-Serindesaminase betrifft, zeigt, daß neben jenem Mechanismus, bei dem Permeasen eine Rolle spielen, noch andere Angriffspunkte der Glucose bei der Regulation in Betracht kommen.

2. Die Endprodukt-Hemmung

McFall und Mandelstam (1963) konnten nachweisen, daß Galactose auch dann eine hemmende Wirkung auf die Synthese von β -Galactosidase hat, wenn sie nicht in Galactose-Phosphat umgewandelt werden kann. Genauso hemmt Galactose-1-Phosphat in Transferase-negativen Mutanten, die Galactose-1-Phosphat nicht mehr in UDP-Galactose umwandeln können, die β -Galactosidase-Synthese. Diese wird durch Glucose weniger als durch Galactose und durch Pyruvat kaum gehemmt. Daraus folgt, daß Galactose oder Galactose-1-Phosphat eine direkte spezifische Wirkung auf die β -Galactosidase-Synthese haben. Als Wirkungsmechanismus ist eine Hemmung der Synthese durch allosterische Wechselwirkung mit naszierendem Enzym in Betracht zu ziehen. In Analogie dazu wird die Tryptophanase-Synthese wesentlich stärker durch Pyruvat gehemmt als durch Glucose. Galactose hat nur einen geringen

Einfluß auf die Synthese dieses Enzyms. Die Wirkung der Substanzen, die keine Endprodukte sind, beruht auf Kataboliten-Repression.

3. Die Kataboliten-Repression

Kataboliten-Repression im engeren Sinne wird durch Kohlenstoffverbindungen bewirkt, die durch Bakterien besonders schnell abgebaut werden können. Nach den Vorstellungen von Magasanik (1961) sowie Neidhardt und Magasanik (1957) entstehen bei diesem Abbau "katabolische" Co-Repressoren.

a Das Auftreten der Kataboliten-Repression

i Stickstoffmangel

Die Kataboliten-Repression zeichnet sich dadurch aus, daß durch eine Limitierung der Stickstoffquelle (Mandelstam, 1962) die Repression wesentlich verstärkt wird. Durch dosierten Zusatz geringer Mengen von stickstoffhaltigen Substanzen zum Medium kann, wenn diese limitierender Faktor sind, die Generationszeit der Bakterien gezielt verlängert werden (Mandelstam, 1962). Das Wachstum der Zellen richtet sich nach dem Stickstoffgehalt des Mediums und ist linear, wenn ein gleichmäßiger Zusatz von Ammonium-Salzen erfolgt. Wird die Generationszeit verdreifacht, unterdrückt Glucose fast vollständig die induzierte oder konstitutive Synthese von β -Galactosidase. Ähnlich sind die Effekte anderer Kohlenstoff-Donatoren wie Glycerin, Lactose, Gluconat,

Galactose. Weniger wirksam sind Succinat, Fructose und Lactat (Mandelstam, 1962). Die gedrosselte Enzymsynthese wird wieder normal, wenn den Bakterien durch Zusatz von Stickstoffsalzen im Überschuß logarithmisches Wachstum ermöglicht wird.

ii Mangelmedien

Die Generationszeit von Bakterien kann auch auf verschiedenen anderen Wegen künstlich verlängert werden. In jedem Fall aber wird eine gesteigerte Reprimierbarkeit beobachtet. Praktisch kann fast jeder Mangel eines essentiellen Nährstoffes zu einer Verstärkung der Kataboliten-Repression führen. Gut untersuchte Beispiele sind Phosphat-Mangel (McFall und Magasanik, 1962; Moses und Prevost, 1966), Magnesium-Mangel (McFall und Mandelstam, 1963) und Schwefel-Mangel (Clark und Marr, 1964). Auch durch Mangel an einem für eine Mutante essentiellen Stoff kann die Kataboliten-Repression verstärkt werden. Neben Aminosäure-Mangel-Mutanten wurden Bakterien untersucht, die Thymin zum Wachstum brauchen (McFall und Magasanik, 1960; McFall und Magasanik, 1962; Clark und Marr, 1964; Sypherd und Strauss, 1963). Nachdem Thymin-Mangel-Mutanten in glycerinhaltigem Medium für einige Zeit ohne Thymin gehalten wurden, war die Enzym-Induktion vollständig gehemmt. Jedoch wurde β -Galactosidase wieder induzierbar, wenn die Kohlenstoffquelle, das Glycerin, aus dem Medium entfernt wurde (McFall und Magasanik, 1960). Dieses klassische

Experiment führte zur Definition der "Kataboliten-Repression" (Magasanik, 1961). Die Synthese der alkalischen Phosphatase, welche der Kataboliten-Repression nicht unterliegt, wurde in Glycerin-Medium unter Thyminmangel-Bedingungen nicht gehemmt.

iii Hemmstoffe

Die Generationszeit der Bakterien kann auch durch Hemmstoffe verlängert werden. Durch geringe Konzentrationen an Chloramphenicol kann der hemmende Einfluß von Glucose und Glycerin auf die Synthese von β -Galactosidase gesteigert werden (Sypherd und Strauss, 1963). Auch nach Zusatz von 5-Fluorouracil zu Glycerin-haltigem Medium wird eine stärkere Hemmung der β -Galactosidase-Synthese als der Gesamt-Protein-Synthese beobachtet. In Succinat-Medium dagegen sind die Hemmeffekte fast gleich (Horowitz und Kohlmeier, 1967).

iiii Schädigung der Zellen durch energiereiche Strahlung

Die Kataboliten-Repression wird besonders augenfällig, wenn Bakterien durch energiereiche Strahlung geschädigt werden. Die Induzierbarkeit der β -Galactosidase wird wesentlich stärker durch UV-Bestrahlung gesenkt als die Gesamtprotein-Synthese (Bowne und Rogers, 1962; Pardee und Prestidge, 1963, 1967). Nach Wachstum in ^{32}P -Phosphat-haltigem Medium

nimmt die Induzierbarkeit von β -Galactosidase in Glycerin-Medium infolge des radioaktiven Zerfalls mit der Zahl der überlebenden Bakterien und schneller als die Dereprimierbarkeit von alkalischer Phosphatase ab. In Kohlenstoff-freiem Medium wird die Synthese der Lactose-abbauenden Enzyme hingegen sowohl durch UV-Bestrahlung als auch durch ^{32}P -Zerfall wie die Gesamt-Protein-Synthese bzw. die Synthese der alkalischen Phosphatase inaktiviert (Riley und Pardee, 1962; Pardee, 1958; Riley, Pardee, Jacob und Monod, 1960; McFall, Pardee und Stent, 1958; McFall, 1961).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Kataboliten-Repression sich manifestiert, wenn der Zellstoffwechsel geschädigt wird, sei es durch Mangel an essentiellen Nährstoffen, durch Hemmstoffe oder durch energiereiche Strahlung.

b Die Auswirkung der Kataboliten-Repression auf die Zellfunktionen

i Stoffwechsel

Ebenso mannigfaltig wie die Möglichkeiten, die Repression zu beeinflussen, sind die begleitenden Veränderungen im Zellstoffwechsel, die als Ursache für den Effekt in Betracht kommen. Glucose im Wachstumsmedium führt u. a. zu Steigerungen der Konzentration von Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat, Fructose-1,6-Phosphat und NADPH. ATP, NADH und eine Reihe von Zucker-Phosphaten, die bei der Glycolyse auftreten, bleiben dagegen

konstant (Prevost und Moses, 1967). Eine bedeutende Rolle für die Kataboliten-Repression spielt wahrscheinlich die Beeinflussung des Pentose-Phosphat-Zyklus durch den Abbau der Kohlenstoffverbindungen des Mediums (Loomis und Magasanik, 1966; Prevost und Moses, 1967).

ii Protein- und RNA-Synthese

Wachstum und Proteinsynthese werden bei Zusatz von Glucose zu Glycerin-haltigem Medium gesteigert. Auch die RNA-Synthese wird unter diesen Bedingungen, welche zur Kataboliten-Repression führen, stimuliert. Bei Verlängerung der Generationszeit durch Chloramphenicol wird die Synthese von β -Galactosidase gesenkt und gleichzeitig die RNA-Synthese gesteigert (Sypherd und Strauss, 1963). Parallel zur "Übergangs-Repression", die unmittelbar nach Zusatz von Glucose zum Glycerin-Medium auftritt, wird die RNA-Synthese gesteigert (Moses und Prevost, 1966). Anscheinend besteht ein Zusammenhang zwischen RNA- und Proteinsynthese einerseits und Kataboliten-Repression andererseits. Über die Rolle der DNA-Synthese bei der Kataboliten-Repression ist wenig bekannt. In dieser Arbeit soll das Verhältnis der DNA-Replikation zur Kataboliten-Repression untersucht werden.

III Beziehung zwischen DNA-Replication und Kataboliten-Repression

Für die Beantwortung der Fragen, ob und wenn ja welcher Zusammenhang zwischen DNA-Synthese und Kataboliten-Repression besteht, ist es naheliegend zu untersuchen, in welcher Weise sich eine Beeinflussung der DNA-Synthese auswirkt. Da praktisch eine Steigerung der DNA-Synthese gezielt nicht möglich ist, konzentriert sich das Interesse auf die Hemmung.

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, die Replikation zu blockieren bzw. ihre Rate zu verringern, z. B. durch die Antibiotica Phleomycin und Mitomycin.

A Die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Phleomycin

Phleomycin verhindert in geringen Konzentrationen die DNA-Replikation, ohne einen Einfluß auf die Synthese von RNA und Protein zu haben (Tanaka, Yamagudu und Umezawa, 1963). Wahrscheinlich setzt dieses Antibioticum Einzelstrangbrüche in der DNA und behindert auf diese Weise die Replicase in ihrer Funktion. Damit entspricht dieses Antibioticum den Voraussetzungen und ist für die Untersuchung des Einflusses der DNA-Replikation auf die Kataboliten-Repression geeignet.

Als Maß für die Kataboliten-Repression wurde die Synthese des Enzyms β -Galactosidase in *E. coli* gewählt. Dieses System hat gegenüber anderen eine Reihe von Vorteilen: 1) Es ist genetisch

und in bezug auf Regulationsphänomene sehr gut analysiert.

2) Der β -Galactosidase-Test ist einfach und sehr empfindlich.

3) Die Experimente über Kataboliten-Repression nach Verlängerung der Generationszeit, die die im folgenden dargestellten Untersuchungen anregten, wurden im gleichen System durchgeführt. Die Experimente wurden mit Kulturen von *E. coli* durchgeführt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Als Nährboden diente ein Glycerin-Salz-Medium, dem Phleomycin zugesetzt wurde. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Synthese von β -Galactosidase induziert. Die Ergebnisse wurden mit Kontrollen verglichen, die kein Antibioticum erhielten.

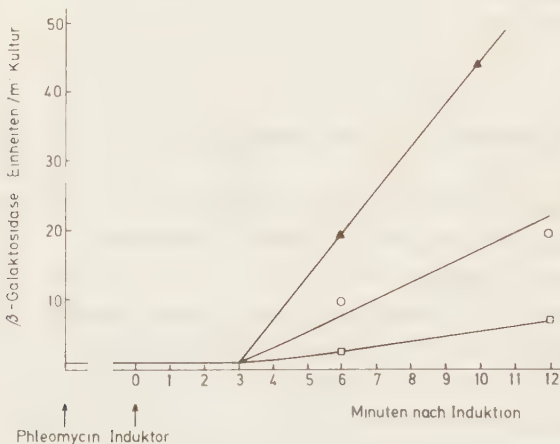


Abb. 2: Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Phleomycin.

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden 1 : 10 in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bis zur Konzentration 1×10^8 Zellen/ml gezogen. 10 μ g/ml Phleomycin wurden zugesetzt: a) 20 min □—□—□ b) 45 min ○—○—○ c) Die Kontrollkultur wurde ohne Phleomycin-Zusatz induziert ▲—▲—▲. Für den Test

der β -Galactosidase wurden 1 ml-Aliquote mit einem Tropfen Toluol 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml einer Lösung von o-Nitrophenyl- β -Galactosid (ONPG) in Wasser (Endkonzentration 10^{-2} M) zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 28 °C wurde 1 ml 1 M Na_2CO_3 hinzugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Konzentration des freigesetzten, gelben O-Nitrophenols wurde bei 420 nm gemessen.

Durch Phleomycin wird die Induktion der β -Galactosidase gehemmt (Abb. 2). Am stärksten ist die Hemmung nach 20 min. Inkubation mit dem Antibioticum; nach 45 min ist sie schwächer. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß Phleomycin abgebaut wird und die Einzelstrangbrüche in der DNA von den bekannten Reparaturmechanismen der Zelle beseitigt werden.

B Die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Mitomycin C

Um auszuschließen, daß die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Phleomycin eine spezifische Wirkung dieses Antibioticums auf die β -Galactosidase-Aktivität oder -Synthese ist, wurden Experimente mit Mitomycin C durchgeführt. Mitomycin C ist ein carcinostatisches Antibioticum und hemmt spezifisch die zelluläre DNA-, aber nicht die RNA- oder Protein-Synthese (Shiba, Terawaki, Taguchi und Kawamata, 1959). Wie bei den Versuchen mit Phleomycin wurden in Glycerin-Medium logarithmisch wachsende Bakterien-Kulturen mit Mitomycin C versetzt und nach verschiedenen Zeiten mit IPTG induziert. Als Kontrollen dienten Proben ohne Antibioticum.

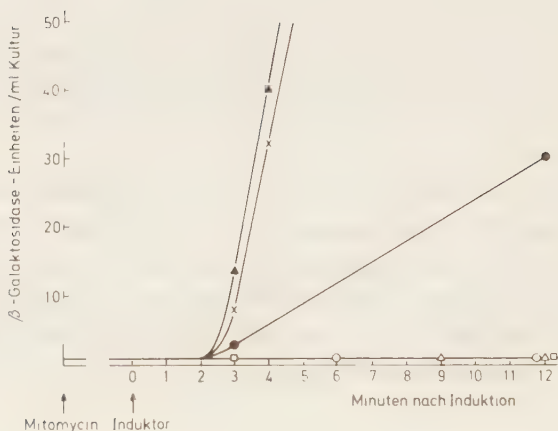


Abb. 3: Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Mitomycin

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden 1 : 10 in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bis zur Konzentration 3×10^8 Zellen/ml gezogen. Mitomycin C wurde zugesetzt, und zwar:

- a) 2 μ g/ml, 5 min x—x—x
- b) 2 μ g/ml, 25 min ●—●—●
- c) 2 μ g/ml, 45 min □—□—□
- d) 4 μ g/ml, 35 min △—△—△
- e) 6 μ g/ml, 30 min o—o—o ,
bevor mit IPTG induziert wurde.
- f) Die Kontrolle wurde ohne Mitomycin-Zusatz induziert. ▲—▲—▲

β -Galactosidase wurde in 1 ml Proben bestimmt. Nach dem Schütteln mit Toluol für 30 min bei 37 °C wurde ONPG zugesetzt (10^{-2} M). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 28 °C wurde die Enzymreaktion durch Zusatz von 1 ml 1 M Na_2CO_3 abgestoppt und anschließend die Extinktion bei 420 nm gemessen.

Der Einfluß von Mitomycin C auf die Induktion der β -Galactosidase (Abb. 3) ist abhängig von der Konzentration des Antibiotikums und der Zeit der Präinkubation. Wenn 2 μ g Mitomycin C 5 min auf die Zellen einwirkte, war die Induktion nur wenig gehemmt. Nach 25 min war die Wirkung der selben Dosis des Antibiotikums wesentlich stärker und nach 45 min Präinkubation wurde die Induktion der β -Galactosidase vollständig unterdrückt. Vollständige Hemmung der Induktion wurde auch nach kürzerer Präinkubationszeit mit einer größeren Menge von Mitomycin C erreicht.

Da bekannt ist, daß Mitomycin-C-Zusatz zu einer Quervernetzung der DNA führt (Iyer und Szybalski, 1963), können mit Mitomycin C gewonnene Resultate möglicherweise wie folgt interpretiert werden: 2 μ g des Antibiotikums schaffen auf dem primer-DNA-Faden durch Quervernetzung eine kleine, mit der Zeit wachsende Anzahl von Hemmpunkten für die DNA-Polymerase. Die meisten Replicase-Moleküle haben nach kurzen Präinkubationszeiten diese Vernetzungspunkte noch nicht erreicht und replizieren weiter die DNA und damit unter anderem auch das Lactose-Operon. In einem längeren Zeitraum der Mitomycin-Einwirkung werden mehr Vernetzungsstellen gebildet, so daß eine größere Anzahl von Replicase-Molekülen bereits bei Zusatz des Induktors blockiert ist. Die Wahrscheinlichkeit, daß das Lactose-Operon repliziert wird, ist damit geringer. Eine große Anzahl von Vernetzungspunkten wird schon nach relativ kurzer Zeit der Einwirkung höherer Mitomycin-C-Konzentrationen gebildet. Die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion reziprok zur DNA-Replikation, proportional zur Zeit der Einwirkung und zur Konzentration an Mitomycin steht im Einklang mit der Annahme, daß ein enger Zusammenhang zwischen Induktion und Replikation besteht.

C Der Angriffspunkt des Mitomycin C bei der induzierten Synthese von β -Galactosidase

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung der Replication durch Phleomycin und Mitomycin C die Synthese von β -Galactosidase nach Induktion einschränkt bzw. ganz unterdrückt, wenn das Antibioticum vor dem Induktor wirksam werden konnte. Es bleibt zu klären, ob die Hemmung der Replication die Induktion selbst oder die Synthese des Enzyms inhibiert. Zur Prüfung dieser Frage wurde die Replication nach der Induktion der β -Galactosidase-Synthese blockiert.

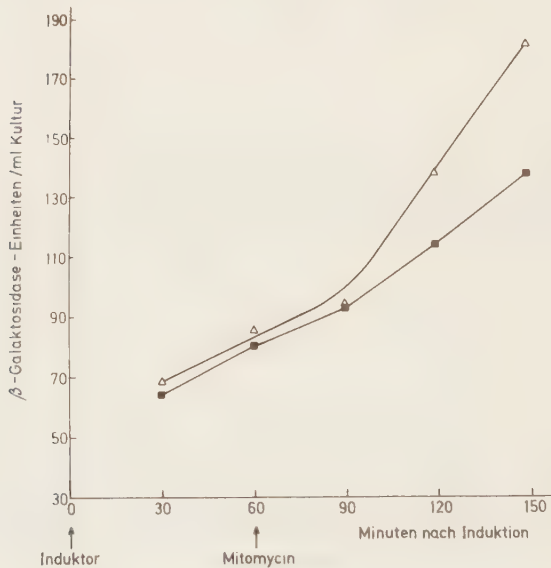


Abb. 4: Die induzierte Synthese von β -Galactosidase in
Gegenwart von Mitomycin C.

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden 1 : 10 in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bis $1-3 \times 10^8$ Zellen/ml gezogen. Zur Zeit Null wurde β -Galactosidase mit IPTG (10^{-3} M Endkonzentration) induziert. 60 Minuten später wurde zu der einen Hälfte der Kultur 6 μ g/ml Mitomycin C hinzugefügt ■—■—■ . Die andere Hälfte der Kultur wurde als Kontrolle ohne Mitomycinzusatz benutzt ▲—▲—▲ .

Der Einfluß von Mitomycin C auf die induzierte Synthese von β -Galactosidase ist nur gering (Abb. 4). Die Differenz zur Kontrolle, die nach längerer Inkubation mit Mitomycin auftritt, kann auf einen Gen-Dosis-Effekt zurückgeführt werden. Während in der Kontrolle das Lactose-Operon ständig vermehrt wird, ist die Replication in der Kultur mit Mitomycin C gehemmt.

Aus den Experimenten über die Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Mitomycin geht hervor, daß, wenn 6 μ g des Antibioticum 30 Minuten vor der Induktion zugesetzt werden, die Synthese des Enzyms vollständig gehemmt wird. Von der gleichen Menge Mitomycin wird dagegen die Enzym-Synthese nur wenig beeinflusst, wenn der Zusatz 60 min nach der Induktion erfolgt. Daraus läßt sich entnehmen, daß die Blockierung der Replication durch dieses Antibioticum eine Hemmung des Induktionsvorgangs und nicht eine Hemmung der induzierten Enzym-Synthese bewirkt.

D Der Einfluß von Mitomycin C auf die DNA-, RNA- und Protein-Synthese

Hohe Konzentrationen von Mitomycin C beeinflussen auch die Synthese von RNA und Protein (Shiba, Terawaki, Taguchi und Kawamata, 1958; Suzuki und Kilgore, 1967). Um sicher zu sein, daß die Mengen, die für die beschriebenen Experimente benutzt werden (2 - 6 μ g/ml) nicht auch schon die Synthese von RNA

und Protein hemmen, wurden der DNA-, RNA- und Protein-Gehalt von *E. coli*-Kulturen nach Inkubation mit Mitomycin gemessen (s. Abb. 5).

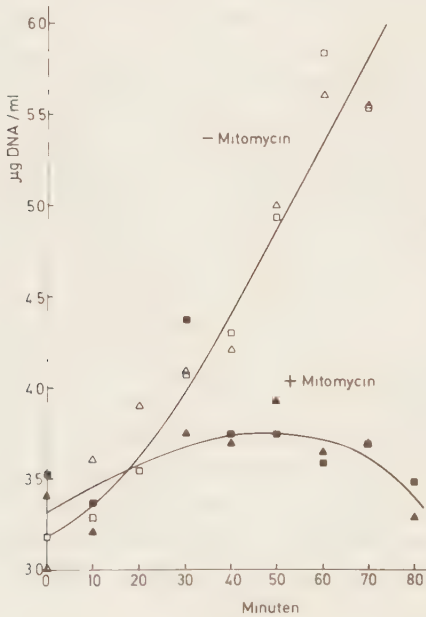


Abb. 5: Synthese von DNA in Gegenwart von Mitomycin C.

Eine belüftete Kultur von K12 W3110 in M9-Glycerin-Medium und bei 37 °C wurde bei einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml halbiert. Zur Zeit Null wurden 4 µg/ml Mitomycin C zu der einen Hälfte zugesetzt. Die andere Hälfte wurde als Kontrolle benutzt. Die Nucleinsäuren wurden nach Schneider (1945) extrahiert, die DNA wurde nach Burton (1956) bestimmt. Abb. 5 zeigt unabhängige Experimente:

△—△—△ und □—□—□ sind die Kontrollen
▲—▲—▲ und ■—■—■ in Gegenwart von Mitomycin.

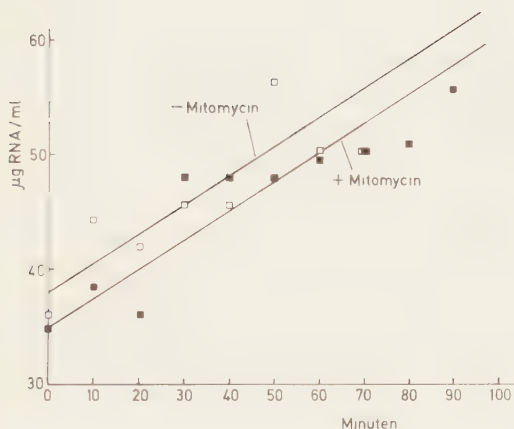


Abb. 6: Synthese von RNA in Gegenwart von Mitomycin C.

Eine belüftete Kultur von K12 W3110 in M9-Glycerin-Medium und bei 37 °C wurde bei einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml halbiert. Zur Zeit Null wurden 4 µg/ml Mitomycin C zu der einen Hälfte zugesetzt. Die andere Hälfte wurde als Kontrolle benutzt. Die Nucleinsäuren wurden nach Schneider (1945) extrahiert, die RNA wurde nach Mejbaum (1939) bestimmt.

□—□—□

Kontrolle

■—■—■

in Gegenwart von Mitomycin.

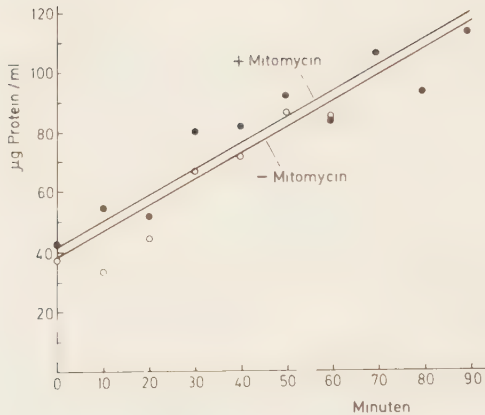


Abb. 7: Protein-Synthese in Gegenwart von Mitomycin

Eine belüftete Kultur von *E. coli* K12 W3110 in M9-Glycerin-Medium und bei 37 °C wurde bei einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml halbiert. Zu der einen Hälfte wurden 4 µg/ml Mitomycin C gegeben, ●—●—●, die andere Hälfte erhielt kein Antibioticum, ○—○—○, und wurde als Kontrolle benutzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Nucleinsäuren nach Schneider (1945) extrahiert. Protein wurde nach der Methode von Lowry (et al. 1951) bestimmt.

Aus den Abbildungen ergibt sich, daß 4 µg Mitomycin C die Synthese von DNA fast vollständig hemmen. Dagegen wird die Synthese von Protein und RNA praktisch nicht beeinträchtigt.

DISKUSSION

I Die Hemmung der Enzym-Induktion durch Hemmung der DNA-Replication

Die spezifische Hemmung der DNA-Replication durch Phlecomycin oder Mitomycin C führt zu einer Hemmung der Induktion von β -Galactosidase, wenn die Induktion nach dem Antibioticum-Zusatz erfolgt (Abb. 2 und 3), nicht jedoch, wenn bereits vor dem Antibioticum-Zusatz induziert wird (Abb. 4). In der Literatur sind in bezug auf die Kataboliten-Repression eine Reihe von Phänomenen beschrieben worden, die sich bislang nicht deuten ließen. Aus der Perspektive der in dieser Arbeit demonstrierten Induktionshemmung infolge von Inhibition der DNA-Replication erscheinen diese Experimente erklärbar.

Eine Hemmung der Induzierbarkeit der β -Galactosidase wurde nach UV-Bestrahlung (Halvorson und Jackson, 1956; Torriani, 1956; Novelli, Kameyama und Eisenstadt, 1961; Bowne und Rogers, 1962; Pardee und Prestidge, 1963; Pardee und Prestidge, 1967), Thymin-Mangel (McFall und Magasanik, 1960, 1962; Barner und Cohen, 1954; Brock und Brock, 1960), ^{32}P -Suicid (Riley und Pardee, 1962; Pardee, 1958; Riley, Pardee, Jacob und Monod, 1960; McFall, Pardee und Stent, 1958; McFall, 1961) und Schädigung durch ^3H -Thymidin (Rachmeler, 1961) beobachtet.

Die induzierte Enzym-Synthese ist gegen UV-Bestrahlung (Halvorson und Jackson, 1956; Torriani, 1956) besonders empfindlich, wenn während der Initialphase der Induktion bestrahlt wird. Die ausgeprägte Empfindlichkeit der β -Galactosidase-Synthese gegen

UV-Bestrahlung in der Initialphase deutet darauf hin, daß die Induktion empfindlicher als die Enzym-Synthese ist.

UV-Licht schädigt in schon relativ kleinen Dosen die DNA-Synthese. RNA- und Protein-Synthese sind um mehrere Zehnerpotenzen weniger empfindlich. Das ist nicht erstaunlich, wenn man davon ausgeht, daß schon einige wenige Treffer im Genom die Replication stören, daß aber die RNA- und mit ihr die Protein-Synthese erst herabgesetzt werden, wenn jedes einzelne Cistron einige UV-Treffer erhält.

Eine deutliche Parallelität zwischen Hemmung der Enzym-Induktion und der Inhibition der DNA-Replication ergibt sich aus den Experimenten von Novelli, Kameyama und Eisenstadt (1961). Danach nimmt die Induzierbarkeit von β -Galactosidase nach verschiedenen Dosen von Licht im gleichen Maß ab wie die DNA-Synthese und die Fähigkeit zur Kolonienbildung und viel stärker als die Gesamt-Protein- und RNA-Synthese (Novelli, Kameyama und Eisenstadt, 1961).

In ähnlicher Weise ist die Synthese der induzierten Enzyme Penicillinase im *Bacillus cereus* (Torriani, 1956) und β -Glucosidase in Hefe (Halvorson und Jackson, 1956) gegen UV-Bestrahlung vor der Induktion empfindlicher als nach dem Beginn der Synthese. Ähnliches gilt für β -Galactosidase (Pardee und Prestidge, 1963).

Im Gegensatz zur Induktion ist die Derepression von Enzymen gegen UV-Bestrahlung wesentlich unempfindlicher; z. B. nimmt die Dereprimierbarkeit der Ornithin-Transcarbamylase-Synthese nur im gleichen Ausmaß ab, wie die Protein-Synthese geschädigt wird (Bowne und Rogers, 1962).

Die hohe Empfindlichkeit der Induktion von β -Galactosidase nach UV-Bestrahlung wird, wie übrigens auch beim Thymin-Mangel, (McFall und Magasanik, 1960) nur manifest, wenn eine Kohlenstoffquelle wie z. B. Glycerin im Medium enthalten ist. Dieser Effekt ist reversibel. Werden nämlich Bakterien in Glycerin-Medium bestrahlt und anschließend in Mineral-Medium ohne Glycerin gebracht, nimmt die induzierte β -Galactosidase-Synthese nur parallel zur Gesamt-Proteinsynthese ab. Wird dagegen in Mineral-Medium bestrahlt und dann Glycerin zugefügt, nimmt die Induzierbarkeit parallel zur DNA-Synthese und der Fähigkeit zur Bildung von Kolonien ab (Pardee und Prestidge, 1963).

Einbau von hohen Dosen von ^{32}P -Phosphat in die DNA führt durch radioaktiven Zerfall ebenfalls zu einer Schädigung des genetischen Materials und damit zur Abnahme der Zahl der überlebenden *E. coli*-Zellen (Barner und Cohen, 1954; Fuerst und Stent, 1956). Die Effekte ähneln denen, die durch Thymin-Mangel hervorgerufen werden (Brock und Brock, 1960). Durch ^{32}P -Zerfall in der Zelle wird die Induktion der Synthese von β -Galactosidase gehemmt (Pardee, 1958). Die fortgesetzte Replication des genetischen Materials scheint demnach eine Voraussetzung für die Synthese von β -Galactosidase zu sein (Riley, Pardee, Jacob und Monod, 1960). Die Fähigkeit zur induzierten Enzym-Synthese fällt auch nach ^{32}P -Zerfall parallel zur Fähigkeit, Kolonien zu bilden (McFall, Pardee und Stent, 1958). Das zeigt, daß nicht einfach die Inaktivierung der betroffenen Struktur-Gene für den Effekt verantwortlich ist. Die Hemmung der Induzierbarkeit tritt, wie auch beim Thymin-Mangel, nur auf, wenn eine Kohlenstoffquelle wie z. B. Glycerin im Medium vorhanden ist.

Die Hemmung der Induzierbarkeit geht also mit der Dosis der UV-Bestrahlung, der Zeitdauer des Thymin-Hungers oder dem Ausmaß des ^{32}P -Zerfalls sowie der Überlebensrate parallel, wohingegen die Gesamtprotein-Synthese wesentlich weniger betroffen wird. Auf der anderen Seite ist die Synthese einer Reihe anderer *E. coli*-Enzyme, wie z. B. alkalische Phosphatase und Ornithintranscarbamylase, die dereprimierbar sind, vergleichsweise unempfindlich.

II Deutung der Hemmung der Enzym-Induktion

A "Cytoplasmic alteration hypothesis"

Grundsätzlich scheint die Induktion der Synthese aller Enzyme, die der Kataboliten-Repression unterliegen, durch UV-Bestrahlung, Thymin-Hunger und ^{32}P -Zerfall stark gehemmt zu werden. Die Hemmung tritt nur auf, wenn das Medium eine Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Glucose enthält. Zur Erklärung dieses Effektes schlägt McFall (1961) die "cytoplasmic alteration hypothesis" vor (Riley und Pardee, 1962). Danach wird durch UV-Bestrahlung, Thymin-Hunger und ^{32}P -Zerfall die DNA-Synthese gehemmt. Als Folge davon wird das metabolische Gleichgewicht im Cytoplasma gestört. Die Störung des Stoffwechsels soll zu einer Überproduktion von Repressoren führen, wie sie für die Kataboliten-Repression gefordert werden (Magasanik, 1961).

B "Nuclear inactivation hypothesis"

Im Gegensatz zu dieser Erklärungsmöglichkeit steht die "nuclear inactivation hypothesis" (Riley und Pardee, 1962). Diese besagt, daß die ungehinderte Replication als eine Voraussetzung für die phänotypische Funktion des ganzen oder eines großen Teiles der DNA anzusehen ist (McFall, Pardee und Stent, 1958).

Eine Entscheidung zwischen beiden Hypothesen ist schwer zu treffen. Für die "cytoplasmic alteration hypothesis" spricht, daß nur Enzyme, die der Kataboliten-Repression unterliegen, die diskutierte Induktionshemmung zeigen, und zwar nur unter Bedingungen, die den Glucose-Effekt begünstigen. Dagegen wird die "nuclear inactivation hypothesis" durch den Befund gestützt, daß UV-Bestrahlung, Thymin-Hunger und ^{32}P -Zerfall, also Einflüsse, die wahrscheinlich einen gemeinsamen Angriffspunkt an der DNA haben, parallel mit der Abnahme der Zahl der Überlebenden zur Induktionshemmung führen.

C Diskussion der Hypothesen

Um zwischen den beiden Hypothesen entscheiden zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß der diskutierte Effekt lediglich durch unspezifische Schädigung der Zelle zustande kommt. Außerdem sollte auf einem unabhängigen und vor allem spezifischen Weg demonstriert werden, daß ein Inhibitor der Replication die Induzierbarkeit hemmt. Da die Antibiotica Phleomycin und Mitomycin

die Forderung nach Spezifität erfüllen, wurden sie als Hemmstoffe der DNA-Synthese verwendet.

Aus der Abhängigkeit der Hemmung der Induktion der β -Galactosidase-Synthese von der Menge und der Zeit der Einwirkung der Antibiotica läßt sich entnehmen, daß der Effekt eine direkte Folge der Wirkung von Phleomycin und Mitomycin C auf die DNA-Replication ist. Dieses Resultat steht in Einklang mit Befunden über die β -Galactosidase-Induktion nach ^{32}P -Zerfall in *E. coli*-Zygoten (Riley und Pardee, 1962; Riley, Pardee, Jacob und Monod, 1960; Starlinger, 1959). Die Induzierbarkeit von β -Galactosidase nimmt nach Zerfall von in *E. coli*-Zellen eingebautem ^{32}P -Phosphat parallel zur DNA-Replication ab (Pardee, 1958; Pardee, Jacob und Monod, 1960; McFall, Pardee und Stent, 1958). Um die Frage, ob die Wirkung des ^{32}P -Zerfalls über das Cytoplasma erfolgt oder ob der radioaktive Zerfall über die Replicationshemmung direkt auf das Lactose-Operon einwirkt, zu beantworten, wurde radioaktives Phosphat in männliche und weibliche Zellen eingebaut, die entweder über ein funktionsfähiges Lactose-Operon verfügten oder denen das Operon fehlte. Dann wurden die 4 möglichen Kombinationen zur Konjugation gebracht und anschließend geprüft, ob die Induzierbarkeit der β -Galactosidase-Synthese in den Zygoten parallel zur Zahl der überlebenden Zellen (DNA-Synthese) oder parallel zur Gesamt-Protein-Synthese abnimmt.

Donorzellen	Recipienten	Abnahme der Induzierbarkeit der β -Galactosidase-Synthese
P^{32} Hfr Z^+	$F^- Z^-$	wie Überlebende
P^{32} Hfr Z^-	$F^- Z^+$	wie Proteinsynthese
Hfr Z^+	$P^{32} F^- Z^-$	wie Proteinsynthese
Hfr Z^-	$P^{32} F^- Z^+$	wie Überlebende

Der Zerfall von radioaktivem Material führte immer dann zu einer starken Hemmung der Induzierbarkeit, wenn das ^{32}P in dem DNA-Strang eingebaut war, der auch das aktive Lactose-Operon enthielt, d. h., wenn ^{32}P zum Lactose-Operon in cis-Stellung war. Dagegen war die β -Galactosidase-Synthese nicht stärker als die Gesamt-Protein-Synthese gesenkt, wenn das radioaktive Phosphat in den DNA-Strang eingebaut war, der das inaktive Lactose-Operon trug, also in trans-Position zum aktiven Operon. Das Struktur-Gen für β -Galactosidase war nach der Überführung in intakte Zellen (durch Transduktion) noch aktiv. Es war also nicht infolge des ^{32}P -Zerfalls zerstört worden (Riley und Pardee, 1962).

Diese Resultate schließen die Möglichkeit aus, daß eine unspezifische Störung des Stoffwechsel-Gleichgewichts, hervorgerufen z. B. durch eine Verlangsamung der Syntheseraten, für den Effekt verantwortlich ist. Ebenfalls ausgeschlossen ist ein direkter Einfluß auf das Lactose-Operon. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Hemmung der DNA-Replication selbst das metabolische Gleichgewicht der Zelle so stört, daß Co-Repressoren der Kataboliten-Repression akkumuliert werden. Wenn dies der Fall wäre, sollte die Kapazität zur Synthese von

β -Galactosidase gleich sein, unabhängig davon, ob die DNA-Replication vor oder nach der Induktion blockiert wurde. Aus den Experimenten mit Mitomycin C geht jedoch hervor, daß eine starke Hemmung der β -Galactosidase-Bildung nur dann auftritt, wenn die Blockierung der DNA-Replication vor der Induktion erfolgt, dagegen wird nur ein geringer Effekt beobachtet, wenn Mitomycin C der Kultur nach der Induktion zugesetzt wird (Abb. 3 und 4).

Diese Ergebnisse führen zu folgenden Schlußfolgerungen:

- a) Die Hemmung der Induktion hat ihre Ursache nicht in einer Störung des Stoffwechsel-Gleichgewichts der Zelle.
- b) Der Effekt ist nicht die Folge einer direkten Wirkung der Antibiotica auf das Lactose-Operon.
- c) Die Inhibition der DNA-Synthese greift an der Induktion selbst und nicht an der Synthese des Enzyms im induzierten Zustand an.

Die Schlußfolgerungen stehen in vollem Einklang mit den oben diskutierten Ergebnissen (Riley und Pardee, 1962) über die β -Galactosidase-Induktion nach ^{32}P -Zerfall in *E. coli*-Zygoten.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Gesichtspunkte:

1. Eine Hemmung der Induzierbarkeit wurde auf fünf verschiedenen Wegen erreicht, denen gemeinsam ist, daß sie zu einer Inhibition der DNA-Replication führen.
2. Alle Enzyme, bei denen dieses Verhalten gefunden wurde, unterliegen normalerweise der Kataboliten-Repression.

3. Eine Überschuß-Produktion von Kataboliten-Repressoren durch eine Störung des metabolischen Gleichgewichts kann nicht die Ursache der Induktions-Hemmung sein.
4. Voraussetzung für diese Hemmung ist die Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle im Medium.
5. Die Abhängigkeit der Enzym-Induktion von der DNA-Synthese setzt voraus, daß sich das betroffene Operon zur geschädigten DNA-Struktur in cis-Position befindet.
6. Das Operon selbst wird nicht zerstört.

III Modellvorstellungen zum Mechanismus der Kataboliten-Repression

Auf der Basis dieser Überlegungen kann ein Modell entwickelt werden, das in der Lage ist, den Mechanismus der Kataboliten-Repression zu erklären. Da die Hemmung der Enzym-Synthese nur auftritt, wenn der Induktor zugesetzt wird, nachdem die DNA-Replication blockiert ist und da die Blockierung der DNA-Synthese nach dem Zusatz von Induktor kaum einen Einfluß auf die folgende Enzym-Synthese hat, kann gefolgert werden, daß bei gestoppter Replication die DNA so verändert ist, daß die Transcription eingeschränkt wird. Frisch synthetisierte, also noch unveränderte DNA kann durch den "Operator-Mechanismus" induziert werden. Unter den Bedingungen der Operator-Repression wird die ursprünglich intakte DNA verändert und dadurch irreversibel blockiert. Ein induziertes Operon dagegen bleibt unverändert oder wird zumindest viel langsamer verändert. Eine Veränderung der DNA, die zu ihrer Inaktivierung führt, hängt auf jeden Fall von dem Vorhandensein einer Kohlenstoffquelle im

Medium ab. Wenn *E. coli*-Zellen nach Blockierung der DNA-Replikation in ein Medium ohne Kohlenstoffquelle transferiert werden, erscheint die Induzierbarkeit wieder; nach Rücküberführung in das ursprüngliche Medium tritt die Induktionshemmung wieder auf (Pardee und Prestidge, 1963).

Diese Reversibilität der Repression (Induktions-Hemmung) kann zwei Ursachen haben: Entweder ist die DNA-Veränderung reversibel und abhängig vom Kohlenstoffgehalt des Mediums oder die veränderte DNA ist zwar in kohlenstoffarmem, nicht aber in kohlenstoffreichem Medium funktionsfähig. Die zweite Möglichkeit könnte darauf zurückzuführen sein, daß in kohlenstoffreichem, im Unterschied zum kohlenstoffarmen Medium Substanzen synthetisiert werden, die die Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase an der veränderten DNA mit Hilfe eines allosterischen Effektes hemmen. Für die Kataboliten-Repression kommen also zwei Angriffspunkte in Betracht: a) eine Veränderung der DNA; b) eine Hemmung der Funktion der RNA-Polymerase an der veränderten DNA.

Auf das Vorhandensein zweier Ansatzpunkte deuten Experimente, die zeigen, daß ein Teil der Kataboliten-Repression durch eine Erhöhung der Induktorkonzentration kompensiert werden kann (Clark und Marr, 1964). Der von der Operator-Regulation abhängige Anteil der Kataboliten-Repression wirkt an einem allosterischen Protein, entweder dem Repressor selbst (Jacob und Monod, 1961), dessen Bedarf an Induktor erhöht wird, oder an dem Komplex, der aus Repressor, Induktor und der in Synthese befindlichen Enzymkette besteht (Gruber und Champagne, 1966; Cline und Bock, 1966). Von mehreren Autoren ist über einen Zusammenhang zwischen

Operator-Regulation und Kataboliten-Repression berichtet worden (Lengeler, 1966; Palmer und Moses, 1967; Loomis und Magasanik, 1965, 1967a, 1967b). Da die Synthese von β -Galactosidase durch Galactose wirksamer reprimiert wird als durch Glucose (McFall und Mandelstam, 1963), kann angenommen werden, daß Galactose als Endprodukt durch Wechselwirkung mit dem Komplex aus Repressor und wachsender Peptidkette die β -Galactosidase-Synthese hemmt. Diese Endprodukt-Hemmung kann zumindest partiell durch größere Induktorkonzentration kompensiert werden.

Als Erklärung für den Befund, daß die Induktionshemmung nach Blockierung der Replication nur in Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle auftritt, könnte angenommen werden, daß durch den Stoffwechsel in diesem Fall Galactose gebildet wird, die besonders an der infolge Kataboliten-Repression veränderten DNA über die erörterte Kopplung zwischen Translation und Transcription die Expression des Lactose-Operons behindert. Wenn die Kohlenstoffquelle aus dem Medium entfernt wird, kann die Galactose abgebaut und β -Galactosidase synthetisiert werden, obwohl die DNA nach wie vor verändert ist. Für vollständige Hemmung der Induktion wäre also das Zusammenspiel beider Faktoren, Veränderung der DNA und kohlenstoffreiches Medium, erforderlich.

Es gibt Hinweise darauf, daß die DNA-Veränderung durch Methylierung verursacht wird. Das Ausmaß der Methylierung der DNA hängt vom Medium ab. Im minimalen Glycerin-Medium wird *E. coli*-DNA wesentlich weniger methyliert als in angereichertem Glucose-Medium. Es wurde ferner gefunden, daß der Grad der Methylierung streng von der Wachstumsrate abhängt. In der frühen logarithmischen Phase ist die DNA weniger methyliert als in der frühen stationären Phase, wenn die Replication graduell langsamer

wird. Schließlich hat sich ergeben, daß der Methylierungsgrad umgekehrt proportional ist zur Effektivität der DNA in vitro als Matrize für die RNA-Synthese durch Transcriptase (Schweiger, Sauerbier und Zillig, 1968). Wenn die DNA-Synthese durch Mitomycin C (Medoff und Swartz, 1967) oder Thymin-Hunger (Gold und Hurwitz, 1963) gehemmt wird, steigt der Gehalt der DNA an methylierten Basen (Luzzati, 1966).

Der Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Methylierung kann über den Pool an Einkohlenstoffverbindungen erfolgen. Die Tatsache, daß die Kataboliten-Repression durch Steigerung der Größe der Stickstoffquelle im Medium reduziert wird, kann durch die Beanspruchung des C_1 -Pools für synthetische Reaktionen erklärt werden.

Die Frage, warum einige Enzyme der Kataboliten-Repression unterliegen und andere nicht, ist noch offen. Wenn man annimmt, daß die Veränderung gleichmäßig alle Regionen der DNA betrifft, sollten die Enzyme, die keine Kataboliten-Repression zeigen, unabhängig von der Transcription sein. Tatsächlich wurde für Ornithintranscarbamylase, die nicht durch Glucose reprimiert wird, demonstriert, daß Derepression ohne gleichzeitige RNA-Synthese möglich ist (Rogers und Novelli, 1959). Die Matrizen-RNA für dieses Enzym scheint eine Halbwertszeit von 75 min zu haben. Die m-RNA eines anderen typischen Enzyms, das nicht der Kataboliten-Repression unterliegt, der alkalischen Phosphatase von *E. coli*, zeigt einen Umsatz, der ebenfalls wesentlich geringer ist als der der β -Galactosidase-m-RNA (Rosen, 1965). Die relative Unabhängigkeit der Synthese dieser Proteine von der Transcription entspricht ihrer Unempfindlichkeit für die Kataboliten-Repression.

MATERIAL UND METHODEN

Phleomycin war ein Geschenk von Dr. J. Lein, Bristol Laboratories, Syracuse, New York; Mitomycin C stammte von: Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan; Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und O-Nitrophenylgalactosid (ONPG) waren Produkte von: Mann Research Laboratories, New York, N. Y.

Alle Experimente wurden parallel mit den *Escherichia coli*-Stämmen K12 W3110 und K12 () durchgeführt. Die Bakterien wurden in M9-Glycerin-Medium (Adams, 1959) bei 37 °C gezogen. Das Medium enthielt

15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$,
3 g KH_2PO_4 ,
1 g NH_4Cl ,
0,5 g NaCl und
4 g Glucose in 1 l wässriger Lösung. Die Generationszeiten betrugen 75 bzw. 90 Minuten.

β -Galactosidase-Test: Proben von je 1 ml wurden mit einem Tropfen Toluol 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml einer Lösung von O-Nitrophenyl- β -Galactosid (ONPG) in Wasser (Endkonzentration 10^{-2}M) zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min bei 28 °C wurde 1 ml M Na_2CO_3 -Lösung hinzugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Gelbfärbung wurde bei 420 m μ gemessen.

Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Phleomycin:

Übernachtkulturen der *E. coli*-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden 1 : 10 in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bis zur Konzentration 1×10^8 Zellen/ml wachsen gelassen. 10 $\mu\text{g/ml}$ Phleomycin wurden zugesetzt: a) 20 min, b) 45 min, bevor mit IPTG induziert wurde. c) Die Kontrollkultur wurde ohne Phleomycin-Zusatz induziert. β -Galactosidase wurde wie oben beschrieben getestet.

Hemmung der β -Galactosidase-Induktion durch Mitomycin C:

Übernachtkulturen der *E. coli*-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden 1 : 10 in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bei 3×10^8 Zellen/ml wurde Mitomycin zugesetzt:

- a) 2 ug/ml, 5 min,
- b) 2 ug/ml, 25 min,
- c) 2 ug/ml, 45 min,
- d) 4 ug/ml, 35 min,
- e) 6 ug/ml, 30 min vor der Induktion mit IPTG
- f) Kontrolle ohne Mitomycin.

Galactosidase wurde wie üblich bestimmt (s. oben).

Einfluß von Mitomycin C auf die induzierte Synthese von β -Galactosidase:

Übernachtskulturen der E. coli-Stämme K12 W3110 und K12 (λ) wurden in M9-Glycerin-Medium verdünnt und bis $1-3 \times 10^8$ Zellen/ml wachsen gelassen. Zur Zeit Null wurde β -Galactosidase mit IPTG (10^{-3} M Endkonzentration) induziert. 60 Minuten später wurde zu einer Hälfte der Kultur 6 ug/ml Mitomycin C hinzugefügt. Der andere Teil der Kultur wurde ohne Mitomycin als Kontrolle benutzt.

Die Wirkung von Mitomycin C auf die DNA-, RNA- und Protein-Synthese:

Eine Kultur K12 W3110, die in M9-Glycerin-Medium wuchs, wurde halbiert. Zur Null-Zeit wurden 4 ug/ml Mitomycin C zu einer Hälfte zugesetzt. Die andere Hälfte wurde als Kontrolle benutzt. Die Nucleinsäuren wurden nach Schneider extrahiert. 25 ml der Bakterien-Kulturen wurden bei 0 °C abzentrifugiert und mit je 1 mal kalter 5 %iger Trichloressigsäure (TCA), Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde mit 2 ml 5 % TCA 15 min bei 90 °C extrahiert, mit 1 ml 5 % TCA gewaschen, die Überstände vereinigt und 3 ml aufgefüllt zur Bestimmung der Nucleinsäuren. Der Rückstand wurde mit Äther gewaschen, über Nacht in 0.1 N NaOH stehengelassen und im Überstand Protein mit der Methode von Lowry, Rosebrough, Farr und Randall (1951) gemessen. RNA wurde mit der Orcinol-Methode bestimmt (Mejbaum, 1939), DNA mit der Diphenylamin-Methode (Burton, 1956) analysiert.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	Matrizen-Ribonucleinsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
ONPG	O-Nitrophenyl- β -Galactosid
M9	Mineral-Medium
TCA	Trichloressigsäure

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Problem der Kataboliten-Repression. Unter Kataboliten-Repression versteht man die Hemmung von Enzymsynthesen in Bakterien, die in Kohlenstoffverbindungen-haltigen Medien kultiviert werden. Es werden Experimente beschrieben, auf Grund derer ein Modell entwickelt wird, das den Mechanismus der Kataboliten-Repression erklärt.

Die Antibiotica Phleomycin und Mitomycin C hemmen die DNA-Replikation. Diese Hemmung besitzt eine hohe Spezifität. Es konnte nun gezeigt werden, daß unter den Bedingungen der Kataboliten-Repression durch diese beiden Antibiotica gleichzeitig die Induktion des Enzyms β -Galactosidase gehemmt wird. Dagegen wurde die RNA- und Protein-Synthese von diesen Antibiotica nicht beeinflusst. Fernerhin wurde gefunden, daß Phleomycin und Mitomycin tatsächlich die Induktion selbst und nicht die Synthese der β -Galactosidase nach erfolgter Induktion hemmen. Es wurde schließlich die Möglichkeit ausgeschlossen, daß der Effekt die Folge einer direkten Wirkung der Antibiotica auf das Lactose-Operon ist.

Die folgende Tatsache bildet die Grundlage für ein Modell, das den Mechanismus der Kataboliten-Repression erklärt: Die Hemmung der Enzym-Synthese tritt nur auf, wenn der Induktor zugesetzt wird, nachdem die DNA-Replikation blockiert ist. Umgekehrt hat der Zusatz von Phleomycin und Mitomycin, nachdem die Enzym-Synthese bereits vorher induziert wurde, kaum einen Einfluß auf die Synthese von β -Galactosidase.

Die Modellvorstellung geht davon aus, daß die DNA, wenn die Replication durch die Antibiotica gehemmt ist, so verändert wird, daß die Transcription eingeschränkt wird. Im Gegensatz zu dieser veränderten DNA kann ein Operon, dessen DNA neu synthetisiert ist, also noch unverändert ist, durch den Operator-Mechanismus induziert werden. Die Veränderung der DNA findet nur unter den Bedingungen der Kataboliten-Repression statt. Möglicherweise hat die Kataboliten-Repression neben der DNA-Veränderung noch einen zweiten Angriffspunkt. Es könnte sich dabei um eine allosterische Inhibition der DNA-abhängigen RNA-Polymerase handeln. Dabei würden katabolische Zwischenprodukte die Rolle von allosterischen Effektoren spielen.

Die in dem Modell geforderten Veränderungen der DNA könnten in verschiedenen Graden von Methylierung der DNA bestehen. Diese Annahme wird durch folgende Faktoren gestützt:

1. Methylierung der DNA und Kataboliten-Repression hängen gleichsinnig von den Kulturbedingungen ab.
2. Ein höherer Methylierungsgrad führt zu einer Verminderung der biologischen Aktivität der DNA im DNA-abhängigen RNA-Polymerase-System.
3. Gold und Hurwitz (1963) fanden, daß unter den Bedingungen der Kataboliten-Repression bei Thymin-Mangel eine verstärkte Methylierung der DNA beobachtet wird.
4. Eine stärkere Methylierung wurde auch gefunden (Medoff und Swartz, 1967) nach Mitomycin C-Gaben.

Die eigenen Versuche haben gezeigt, daß in Gegenwart von Mitomycin C eine vermehrte Kataboliten-Repression auftritt.

LITERATUR

- Ames, B. N., und P. Hartman (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 349.
- Adams, M. H., "Bacteriophages" (1959) Interscience Publishers, New York, p. 446
- Armstrong, M. D., K. S. Robinson (1954) Arch. Biochem. 52, 287.
- Armstrong, M. D., F. H. Tyler (1955) J. Clin. Invest. 34, 563.
- Avery, O. T., C. M. MacLeod und M. MacCarty (1944) J. Exptl. Med. 79, 137.
- Baglioni, D. (1963) in "Molecular Genetics", I., ed. by J. H. Taylor, p. 405, N. Y. Acad. Press.
- Barner, H. D., und S. S. Cohen (1954) J. Bacteriol. 69, 80.
- Beckwith, J. (1963) Biochim. Biophys. Acta 76, 162 (Suppression von O^0).
- Beckwith, J. R. (1967) Science 156, 597.
- Bichel, M. (1960) Klin. Physiol. Bd. 1, 87.
- Bowne, S. W., und P. Rogers (1962) J. Mol. Biol. 5, 90.
- Brock, T. C., und M. L. Brock (1960) Bact. Proc. 178.
- Burrows, W., J. W. Moulder und R. M. Lewert (1965) Textbook of Microbiology, Saunders Cie., Philadelphia & London.
- Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315.
- Butenandt, A. (1967) in "Molekularbiologie als Fundament der modernen Medizin", Lehmanns Verlag, München.
- Clark, D. J., und A. G. Marr (1964) Biochim. Biophys. Acta 92, 85.
- Cline, A. L., und R. M. Bock (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 31, 321.
- Coles, N. W., und R. Gross (1965) Biochem. Biophys. Res. 20, 366.
- Coles, R. S., und P. Rogers (1964) Bacteriol. Proc. 87.
- Cori, G. T. (1953) Harvey Lecture 48, 145.
- Dienert, F. (1900) Ann. Inst. Pasteur 14, 139.
- Duclaux, E. (1899) Traité de Microbiologie, Paris: Masson et Cie.
- Fuerst, C. F., und G. S. Stent (1956) J. Gen. Physiol. 40, 73.
- Given, J. (1948) Blood 3, 1238.
- Gold, M., und J. Hurwitz (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 28, 149.
- Gorini, L. (1963) Bacteriol. Rev. 27, 182.

- Gruber, M., und R. N. Campagne (1966) Perspectives in Biol. and Med. 10, 125.
- Halvorson, H., und L. Jackson (1956) J. Gen. Microbiol. 14, 26.
- Herndorn, N. (1954) Res. Rubl. Ass. Nerv. Ment. Dis. 33, 239.
- Horowitz, J., und V. Kohlmeyer (1967) Biochim. Biophys. Acta 142, 208.
- Iyer, V. N., und W. Szybalski (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 355.
- Jacob, F., und J. Monod (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 26, 193 und 389.
- Kirschner, K. (1967) Arzneimittel-Forsch. 17, 1424.
- Klenk, E., und H. Debus (1959) Ann. Rev. Biochem. 28, 39.
- Lengeler, J. (1966) Z. Vererbungsl. 98, 203.
- Loomis, W. F., und B. Magasanik (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 230.
- Loomis, W. F., und B. Magasanik (1966) J. Bacteriol. 92, 170.
- Loomis, W. F., und B. Magasanik (1967a) J. Mol. Biol. 23, 487.
- Loomis, W. F. Jr., und B. Magasanik (1967b) J. Bacteriol. 93, 1397.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- Luzzati, D. (1966) J. Bacteriol. 92, 1435.
- Magasanik, B. (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 249.
- Mandelstam, J. (1961) Biochem. J. 79, 489.
- Mandelstam, J. (1962) Biochem. J. 82, 489.
- Mandelstam, J. (1967) Internat. Congress Biochem., Tokyo.
- Marshall, R. E., C. T. Caskey und M. Nirenberg (1967) Science 155, 820.
- McFall, E., A. B. Pardee und G. Stent (1958) Biochim. Biophys. Acta 27, 282.
- McFall, E., und B. Magasanik (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 610.
- McFall, E. (1961) J. Mol. Biol. 3, 219.
- McFall, E., und B. Magasanik (1962) Biochim. Biophys. Acta 55, 900.
- McFall, E., und J. Mandelstam (1963a) Biochem. J. 89, 391.
- McFall, E., und J. Mandelstam (1963b) Nature, 197, 880.
- Medoff, G., und M. N. Swartz (1967) Bacteriol. 115.
- Mejbaum, W. (1939) Z. Physiol. Chem. 258, 117.

- Moses, V. , und C. Prevost (1966) *Biochem. J.* 100, 336.
- Nakada, D. , und B. Magasanik (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 105.
- Neidhardt, F. C. , und B. Magasanik (1957) *J. Bacteriol.* 73, 260.
- Newton, W. A. , J. R. Beckwith, D. Zipser und S. Brenner (1965) *J. Mol. Biol.* 14, 290.
- Novelli, G. D. , T. Kameyama und J. M. Eisenstadt (1961) *J. Cell. Comp. Physiol.* 58, Suppl. 1, 225.
- Palmer, J. , und V. Moses (1967) *Biochem. J.* 103, 358.
- Pardee, A. B. (1958) *Exp. Cell. Res. Suppl.* 6, 142.
- Pardee, A. B. , und L. S. Prestidge (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 76, 614.
- Pardee, A. B. , und L. S. Prestidge (1967) *J. Bacteriol.* 93, 1210.
- Pelczar, M. J. , und R. D. Reid (1965) "Microbiology" McGraw-Hill N. Y.
- Pfänder, U. (1957) *Acta Genet.* , Basel, 7, 184.
- Pitot, H. , und C. Heidelberger (1963) *Cancer Res.* 23, 1694.
- Pontecorvo, G. (1954) *Caryologia Suppl.* 6, 192.
- Pontecorvo, G. (1956) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21, 171.
- Prevost, C. , und V. Moses (1967) *Biochem. J.* 103, 349.
- Rachmeler, M. (1961) *Fed. Proc.* 20, 254.
- Renwick, J. H. , S. Lawler und V. A. Cowie (1960) *Amer. J. Mm. Crenet.* 12, 287.
- Riley, M. , A. B. Pardee, F. Jacob und F. Monod (1960) *J. Mol. Biol.* 2, 216.
- Riley, M. , und A. B. Pardee (1962), *J. Mol. Biol.* 5, 63.
- Rogers, P. , und G. D. Novelli (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 33, 423.
- Rosen, B. (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 845.
- Rushizky, G. W. , W. Riley, L. S. Prestidge und A. B. Pardee (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 70.
- Schneider, W. (1945) *J. Biol. Chem.* 161, 293.
- Schweiger, M. , W. Sauerbier und W. Zillig (1968) in Vorbereitung
- Sekiguchi, M. , und Y. Takagi (1959) *Nature* 183, 1134.
- Shiba, S. , A. Terawaki, T. Taguchi und J. Kawamata (1959) *Nature* 183, 1056.
- Slonimski, P. P. , R. Acher, G. Pêré, A. Sels und M. Somlo (1965) in: *Mecanismes de Regulation des Activites Cellulaires chez les Microorganismes*, 124, 435 (Eds. Centre Natl. Rech. Sci. , Paris).
- Sadler, J. R. , und A. Novick (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 305.

- Sommerville, R. L. , und C. Yanofsky (1965) J. Mol. Biol. 11, 747.
- Suzuki, H. , und W. Kilgore (1967) J. Bacteriol. 93, 675.
- Syperd, P. S. , und N. Strauss (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 1059.
- Tanaka, N. , H. Yamaguchi und H. Umezawa (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 10, 171.
- Torriani, A. M. (1956) Biochim. Biophys. Acta 19, 224.
- Winkler, U. (1962) Naturwiss. 49, 91.
- Yanofsky, C. (1960) Bact. Rev. 24, 221.
- Zuckerkindl, E. (1964) J. Mol. Biol. 8, 128.

LEBENS LAUF

Am 24. 9. 1936 wurde ich, Manfred Schweiger, als Sohn des Kaufmanns Emil Schweiger und seiner Ehefrau Elsa geborene Pohlmann zu Königsberg/Pr. geboren.

Die Reifeprüfung legte ich 1955 in Berlin ab. Von 1955 bis 1958 studierte ich Medizin an der Humboldt-Universität in Berlin, 1958 gleichzeitig auch Chemie. Von 1958 bis 1960 studierte ich Chemie an der Freien Universität Berlin, wo ich 1959 mein Vordiplom ablegte. 1960/61 studierte ich Chemie an der Universität München. Dort legte ich 1961 mein Diplom-Examen ab. Meine Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Fraktionierung löslicher Ribonucleinsäuren und der Charakterisierung der Fraktionen und wurde unter Anleitung von Herrn Dr. Zachau im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt. Anschließend studierte ich von 1961 bis 1963 Medizin in Köln und legte 1963 ebenfalls in Köln mein Medizinisches Staatsexamen ab. In den darauffolgenden Jahren leistete ich meine Medizinalassistentenzeit ab, die voraussichtlich Anfang 1968 beendet sein wird. Vom Januar 1964 bis zum April 1967 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter Anleitung von Herrn Dr. Zillig über Probleme der Proteinsynthese und ihrer Regulation. Teile dieser Arbeit dienten als Grundlage für Inaugural-Dissertationen, die der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät sowie der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München vorgelegt wurden.

Von 1958 bis 1966 wurde ich durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes, von 1966 bis 1967 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

